

特 集：健康長寿を目指して

宇宙医学から健康長寿へ

—第258回徳島医学会学術集会公開シンポジウム—

内 田 貴 之

徳島大学大学院医歯薬学研究部・生体栄養学分野

(平成31年3月14日受付) (平成31年3月15日受理)

はじめに

加齢や消耗性疾患によって引き起こされる筋萎縮は、高齢化社会の進展に伴いますます大きな問題となってきた。しかし現在のところ、筋萎縮に対する効果的な治療法は、リハビリテーション以外に無いのが実情である。われわれの研究室では、筋萎縮に対して有効な治療法を開発するため、特に筋萎縮の発生メカニズム解明の観点からアプローチを行ってきた。そこで、われわれは筋細胞による重力の感知機構を明らかにするため、複数回の宇宙実験、模擬微小重力モデルを用いた検討を行った。その結果、宇宙空間および微小重力環境下で培養した筋細胞ではいずれも酸化ストレスの増大、細胞内エネルギー代謝の変化が見られた。微小重力環境下で培養した筋細胞ではさらに、ミトコンドリアの断片化の亢進と、筋構成タンパク質量の低下が見られた。これらの結果は、無重力ストレスによって誘導された酸化ストレスが、ミトコンドリアの動態変化を通じて、細胞のエネルギー代謝と筋タンパク質量を制御している可能性を示唆する。

1. IGF-1シグナルと Cbl-b

通常、筋肉は機械的負荷がかかる状態において絶えず合成と分解を繰り返す、そのバランスが保たれることで一定の筋肉量が維持されている。一方で、寝たきりなどの機械的負荷が減少する unloading 環境においては、筋タンパク質の合成が抑制されると同時に、筋タンパク質の分解が亢進し、筋萎縮が進展する。そして、これら筋タンパク質の合成と分解調節に特に重要な役割を果たしているのが insulin-like growth factor-1 (IGF-1) シグナルである (図1)^{1,2)}。これまでの研究でわれわれは、機械的負荷の減少する unloading 環境において、ユビキ

チンリガーゼ Casitas B-lineage lymphoma-b (Cbl-b) によって筋量維持のために重要な IGF-1シグナルが阻害されることで、筋タンパク質の分解亢進が誘導されることを明らかにしてきた³⁾。筋肉においてユビキチンリガーゼ Cbl-b は、IGF-1の細胞内シグナル分子である insulin receptor substrate-1 (IRS-1) を基質としている。IGF-

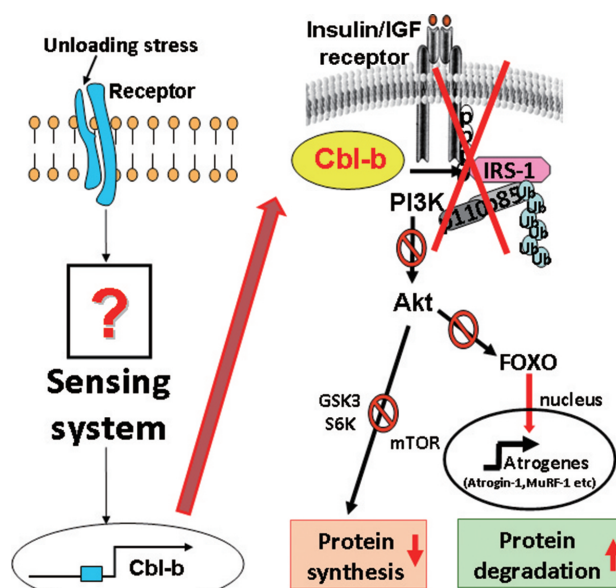


図1. IGF-1シグナルとタンパク質の合成・分解のバランス
IGF-1が細胞膜の受容体に結合すると、IRS-1、PI3K、Aktの順にリン酸化が起こる。Aktの活性化は、S6KやGSKなどの経路を介したタンパク質の合成に関わる。Aktはさらに、筋萎縮関連遺伝子の転写因子であるFOXOをリン酸化することで、その核内移行を妨げる。一方で、微小重力環境などではCbl-bの発現が上昇しIRS-1をユビキチン化・分解に導くことでIGF-1シグナルを阻害する。その結果、リン酸化されずに核内移行が可能となったFOXOによりAtrogin-1やMuRF-1などの筋萎縮関連遺伝子が転写され、タンパク質の分解が亢進し、筋萎縮が起こる。

1シグナルの阻害は、FOXOを介した muscle atrophy F-box protein (MAFbx)/atrogin-1などの筋萎縮関連遺伝子の転写を引き起こし、筋タンパク質の分解が亢進して筋萎縮が発生する⁴⁾。実際、Cbl-b ノックアウトマウスは、unloading による筋量の減少に対して抵抗性を示す。一方でCbl-b のノックアウトは、unloading による筋繊維タイプの変化には影響を与えなかった³⁾。さらに、このCbl-b の働きを阻害するペプチドであるCbl-b inhibitor (Cblin) を投与することで、動物レベルではunloading による筋萎縮を阻害し、細胞レベルでは筋管径の減少や筋萎縮関連遺伝子の発現上昇を抑制することが示された。これらの結果からわれわれは、Cbl-b の発現調節機構を解明することで、筋萎縮をさらに効率的に抑制できるのではないかと考えた。

2. 酸化ストレスによる Cbl-b の発現調節機構

微小重力環境におけるCbl-b の発現調節機構を解明するためにわれわれはまず、宇宙実験「Myolab」を実施した。Myolab 宇宙実験では、L6筋管細胞を宇宙空間に打ち上げ、軌道上で10日間培養したのちに固定し、メタ

ボローム解析を行い代謝産物の網羅的变化を確認した(図2A)。その結果、酸化ストレスの指標である酸化型グルタチオン(GSH)と還元型グルタチオン(GSSG)の比率に変化が見られ、微小重力環境での酸化ストレス(Reactive oxygen species; ROS)の蓄積が示唆された(図2B)。同様の結果は、地上での模擬微小重力モデルである3D-Clinorotation に供したL6筋管細胞でも見られ、無重力ストレスが細胞内に酸化ストレスを蓄積させることが示された(図2C)。これらの結果は、16日間の宇宙フライトを行ったラットの腓腹筋では酸化ストレス応答性の遺伝子発現が上昇していたという、われわれの先行研究と合致する^{5,6)}。

続いてわれわれは、このような酸化ストレスとCbl-b 発現の関連性を検討した。Cbl-b 遺伝子上流領域をルシフェラーゼアッセイにより解析したところ、Cbl-b の上流-60bp から-111bp の間に酸化ストレス応答領域が存在することが確認できた(図3A)。さらに、この上流領域の配列を用いたゲルシフトアッセイと、複数の転写調節因子の抗体を用いたスーパーシフトアッセイにより、酸化ストレス応答性のCbl-b の発現調節を行っているのはEarly growth response-1, 2 (Egr-1, 2)である

A “Myolab” space experiment outline

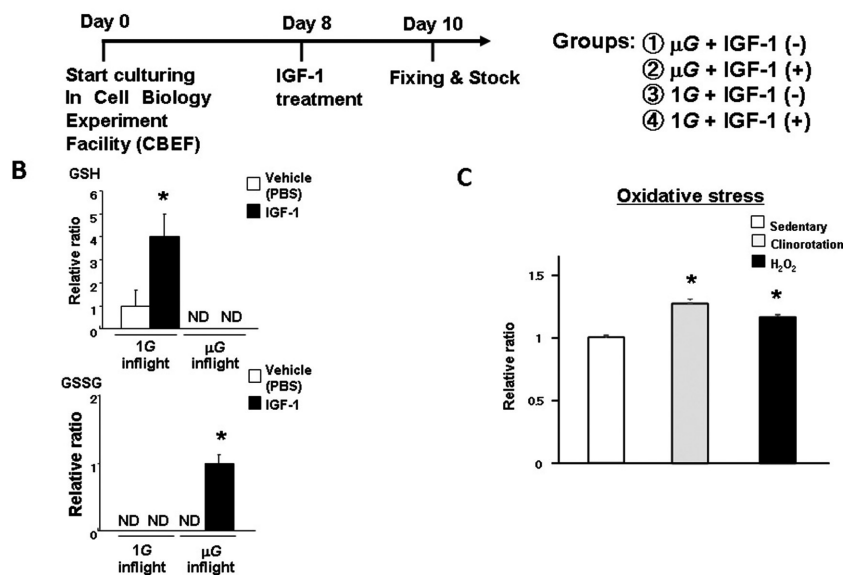


図2 A. 宇宙実験のアウトライン

図2 B. 宇宙空間で培養したL6細胞のメタボローム解析の結果
ここでは還元型グルタチオン(GSH)と酸化型グルタチオン(GSSG)の結果のみを示している。* $p < 0.05$, vs 1G inflight with PBS

図2 C. 3D-Clinorotation に供したL6細胞の細胞内酸化ストレスの計測結果
* $p < 0.05$, vs sedentary

ことが明らかになった (図 3B)。実際に, Egr タンパク質および mRNA の発現レベルは 3D-Clinorotation によって上昇することが確認できた (図 4A)。実際, 3D-Clinorotation 誘導性の Cbl-b の増大は, Egr-1 および Egr-2 のノックダウンによって抑制できることが明らかになった (図 4B)。また, このような 3D-Clinorotation 誘導性の Egr 発現の上昇は, ERK のリン酸化阻害剤の添加によって抑制できた (図 4C) ことから, 微小重力環境における Cbl-b の発現は, ROS-ERK-Egr 経路によって制御されていることが示された。

3. 微小重力環境とミトコンドリア

前述した宇宙空間で 16 日間飼育したラットの腓腹筋では, 酸化ストレス応答性の遺伝子発現のほかに, ミトコンドリアの関連遺伝子にも変化が見られていた。ミトコ

ンドリアは, その内膜に存在する呼吸鎖複合体タンパク質で ATP を産生する際に, 同時に酸化ストレスも発生しているため, 細胞内の主要な酸化ストレス源としての側面も持ち合わせている。そこでわれわれは, 微小重力環境における酸化ストレスの蓄積にはミトコンドリアが関与しているのではないかと考えた。

ミトコンドリアは, 細胞内環境に応じて常に分裂と融合を繰り返す, 動的な細胞小器官である⁷⁾。高脂質食負荷などのストレス環境下では, 多くの場合ミトコンドリアは分裂が亢進して, 短くなったミトコンドリアが多数となる。このミトコンドリアの分裂を制御するのは, 種を超えて保存された GTPase 群の 1 種, dynamin-related protein 1 (Drp1) である^{8,9)}。Drp1 は通常細胞質に局在しているが, リン酸化を受けて活性化するとミトコンドリア外膜の切断点に多数移行して, ミトコンドリアの分断を行う。

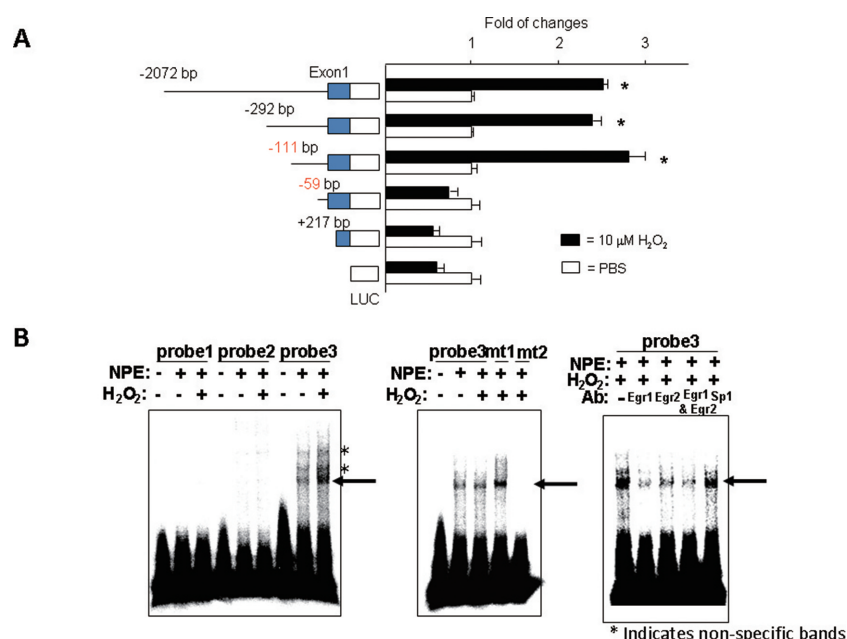


図 3 A. Cbl-b 上流領域のルシフェラーゼアッセイ

Cbl-b の上流領域を, 図に示すような配列に分け, ルシフェラーゼを結合させた。それぞれの配列を強発現させた COS7 細胞に 10 μM の H₂O₂ または PBS を加えた際の結果を示している。* $p < 0.05$, vs PBS

図 3 B. Cbl-b 酸化ストレス応答領域の配列を用いたゲルシフトアッセイ

3A で酸化ストレスに反応が見られた -110 bp から -60 bp を三つの probe に分け, ゲルシフトアッセイを行った。

中でも, probe3 において H₂O₂ に曝露した核抽出蛋白質 (NPE) と強く結合がみられ (左), 変異型 probe3 である mt2 ではこのゲルシフトが見られなかった (中央)。

さらに, 配列から結合が予測された転写調節因子の抗体のうち, Egr1 および Egr2 の抗体を加えた群で, スーパーシフトが観察された (右)。

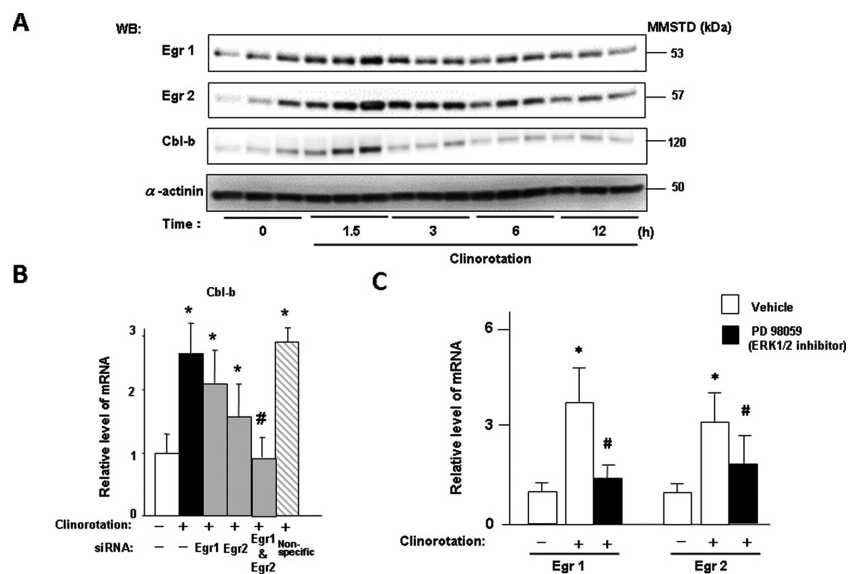


図 4 A. 3D-Clinorotation に供した L6細胞を用いたウェスタンブロット

図 4 B. Egr-1, Egr-2をノックダウンした L6細胞での3D-Clinorotation 誘導性 Cbl-b の mRNA

$p < 0.05$, vs non-clinorotation, # $p < 0.05$, vs non-specific

図 4 C. PBS (Vehicle) または ERK のリン酸化阻害剤 (PD98059) で処理した L6細胞における3D-Clinorotation 誘導性の Egr-1, Egr-2の mRNA

* $p < 0.05$, vs non-clinorotation, # $p < 0.05$, vs Vehicle

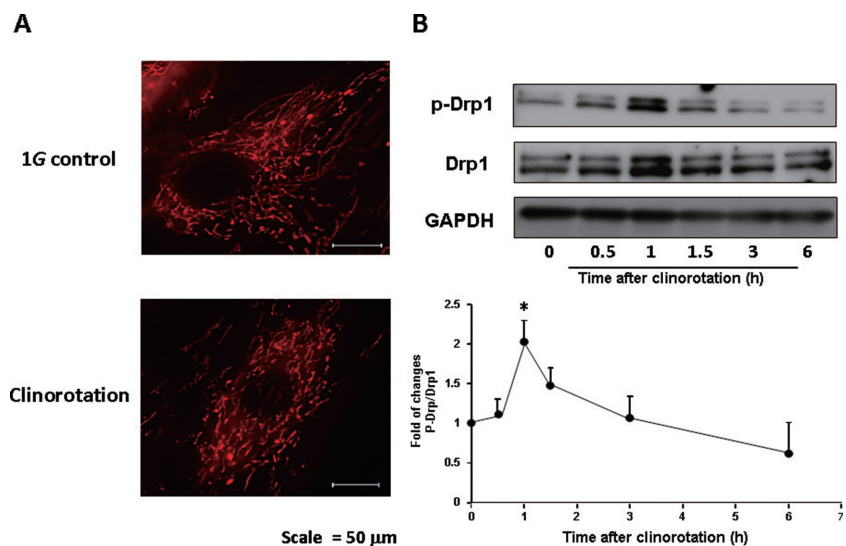


図 5 A. 3D-Clinorotation によるミトコンドリア形態の変化

ミトコンドリア標的配列を有したDsRed2を導入した L6細胞を用いて3D-Clinorotation を1.5時間行った際のミトコンドリア形態を蛍光顕微鏡で観察した。

図 5 B. 3D-Clinorotation によるリン酸化 Drp1の変化

所定の時間3D-Clinorotation を行った L6細胞を用いて、リン酸化 Drp1および Drp1をウェスタンブロットにより確認した (上段)。

図は、Image J ソフトウェアを用いて数値化した値をグラフ化したもの (下段)。

* $p < 0.05$, vs non-clinorotation

実際に、ミトコンドリアを蛍光標識したL6細胞に3D-Clinorotationを行ったところ、対照群と比較して分裂の亢進したミトコンドリアが多く見られた(図5A)。また、ミトコンドリア分裂の指標となるDrp1のリン酸化を確認したところ、3D-Clinorotationによってリン酸化の亢進が確認でき(図5B)、無重力ストレスがミトコンドリアの形態変化を誘導していることが明らかになった。われわれはさらに“Cell mechanosensing”宇宙実験において、実際の宇宙空間でもこのようなミトコンドリア分裂の亢進が観察されることを確認している(データは示さず)。

4. おわりに

本研究では、宇宙空間で培養した筋細胞を用いた解析によって、微小重力環境における筋萎縮の進展で重要な役割を果たす、ユビキチンリガーゼCbl-bの発現調節機構が明らかになった¹⁰⁾。微小重力環境下では細胞内に酸化ストレスが蓄積し、その酸化ストレスがERKのリン酸化、Egrの発現を介してCbl-bの増大を引き起こす。このCbl-bを介した筋萎縮は、阻害ペプチドCblinや、Cblinにミリスチル基を付加して細胞内取り込み量を増大させたC14-Cblinの投与によって抑制することができた¹¹⁾。また、Cblin配列をイネに組み込んで作製したCblin米で筋萎縮抑制効果が確認できた(データは示さず)ことから、宇宙実験で得られた知見を地上で応用する研究も着実に進展してきている。さらにわれわれは、新たな筋萎縮抑制効果を持つ食品成分を探索するため、さらなる宇宙実験を計画している。これらの研究成果が、宇宙飛行士や寝たきり患者の筋萎縮の予防・治療に貢献できることを期待している。

文 献

- 1) Musarò, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., *et al.*: Dobrowolny G Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet.*, **27** : 195-200, 2001
- 2) Schiaffino, S., Mammucari, C.: Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skeletal muscle*, **1** : 4, 2011
- 3) Nakao, R., Hirasaka, K., Goto, J., Ishidoh, K., *et al.*: Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol*, **29** : 4798-4811, 2009
- 4) Stitt, T. N., Drujan, D., Clarke, B. A., Panaro, F., *et al.*: The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*, **14** : 395-403, 2004
- 5) Ikemoto, M., Nikawa, T., Takeda, S., Watanabe, C., *et al.*: Space shuttle flight (STS-90) enhances degradation of rat myosin heavy chain in association with activation of ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J*, **15** : 1279-1281, 2001
- 6) Nikawa, T., Ishidoh, K., Hirasaka, K., Ishihara, I., *et al.*: Skeletal muscle gene expression in space-flown rats. *FASEB J*, **18** : 522-524, 2004
- 7) Okamoto, K., Shaw, J. M.: Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet*, **39** : 503-536, 2005
- 8) Romanello, V., Guadagnin, E., Gomes, L., Roder, I., *et al.*: Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO J*, **29** : 1774-1785, 2011
- 9) Praefcke, G. J., McMahon, H. T.: The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5** : 133-147, 2004
- 10) Uchida, T., Sakashita, Y., Kitahata, K., Yamashita, Y., *et al.*: Reactive oxygen species upregulate expression of muscle atrophy-associated ubiquitin ligase Cbl-b in rat L6 skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **314** : C721-C731, 2018
- 11) Ochi, A., Abe, T., Nakao, R., Yamamoto, Y. *et al.*: N-myristoylated ubiquitin ligase Cbl-b inhibitor prevents on glucocorticoid-induced atrophy in mouse skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys*, **570** : 23-31, 2015

The mechanism of skeletal muscle atrophy : finding from space experiment

Takayuki Uchida

Department of Nutritional Physiology, Institute of Medical Nutrition, Tokushima University Graduate School, Tokushima, Japan

SUMMARY

Skeletal muscle atrophy is a response to decreased physical signals (unloading), such as under microgravity, bed rest and neural inactivation, and is characterized by muscle volume loss and muscle fiber-type switching.

We previously demonstrated that elevated ubiquitin ligase casitas B-lineage lymphoma-b (Cbl-b) resulted in the loss of muscle volume. Here, we showed that the ROS-mediated signal transduction caused by microgravity or its simulation contributes to Cbl-b expression.

In L6 myotubes, the assessment of redox status revealed that oxidized glutathione was increased under microgravity conditions, and simulated microgravity caused a burst of ROS, implicating ROS as a critical upstream mediator linking to downstream atrophic signaling. ROS generation activated the ERK 1/2 early-growth response protein (Egr) 1/2-Cbl-b signaling pathway.

Our results suggest that under microgravity conditions, elevated ROS may be a crucial mechanotransducer in skeletal muscle cells, regulating muscle mass through Cbl-b expression activated by the ERK-Egr signaling pathway.

Key words : Unloading stress, Muscle atrophy, Mitochondria, Reactive oxygen species